



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	mTORC1 inhibition suppresses necroptosis of cardiomyocytes by restoration of autophagic flux via RIP1 inhibition. (mTORC1 活性阻害は、RIP1 活性抑制を介したオートファジーの回復により心筋細胞のネクロプトーシスを抑制する)
Author(s) 著 者	安部, 功記
Degree number 学位記番号	甲第 3023 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2018-03-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌 第 87 巻 1 号 平成 31 年 3 月掲載予定
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3023 号	氏 名	安 部 功 記
<p>mTORC1 inhibition suppresses necroptosis of cardiomyocytes by restoration of autophagic flux via RIP1 inhibition</p> <p>(mTORC1 活性阻害は、RIP1 活性抑制を介したオートファジーの回復により心筋細胞のネクロプトーシスを抑制する)</p> <p>研究目的</p> <p>ネクロプトーシスはプログラム細胞死の一つで心不全や心筋梗塞の病態に関与することが報告されている。TNF-α (TNF) 受容体刺激により、TNF 受容体複合体 (complex I) に結合している receptor-interacting protein (RIP) 1 が細胞質内で Fas-associated death domain (FADD) 及び caspase-8 と複合体 (complex II) を形成し、アポトーシスが誘導される。Caspase-8 活性阻害下では RIP1 は RIP3 とともにネクロソームを形成し、mixed lineage kinase domain-like (MLKL) 分子の多量体化と細胞膜移行・破壊によりネクロプトーシスを引き起こす。</p> <p>一方、心不全や虚血再灌流障害に対して保護的に作動するオートファジーは、ネクロプトーシスに対して両方向性に関与することが示唆されている。最近我々は、1) z-VAD-fmk (zVAD) による caspase 活性阻害下における TNF 刺激 (TNF/zVAD) により心筋細胞においても RIP1/RIP3 依存性ネクロプトーシスが誘導される、2) mTORC1 阻害薬である rapamycin は TNF/zVAD によるオートファジー抑制を改善し、ネクロプトーシスを軽減する、ことを報告した。</p> <p>そこで本研究では、rapamycin が心筋細胞のネクロプトーシスを軽減する機序を RIP1 活性化機構とオートファジーに注目して検討した。</p> <p>研究方法</p> <p>[実験 1] mTOR/p70s6 kinase (p70s6K) 阻害薬がネクロプトーシスに与える影響の検討</p> <p>1) 10%牛血清添加 DMEM 中で H9c2 ラット心筋芽細胞を培養した。培養液に溶媒 (vehicle)、TNF (50 ng/ml)、TNF と pan-caspase 阻害薬である zVAD (20 μM、TNF/zVAD) を添加し、4、8 時間後に細胞を回収し、RIP1、RIP3 あるいは caspase-3 の蛋白量をウェスタンブロット法で定量した。</p> <p>2) Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に vehicle あるいは RIP1 活性阻害薬 (necrostatin-1、50μM) を添加し、24 時間後に測定した全細胞由来の LDH 活性に対する培養液中の LDH 活性の%をネクローシスの指標とした。コントロール siRNA、RIP3 siRNA</p>			

あるいは MLKL siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入し、24 時間後に vehicle、TNF/zVAD を添加した。添加 24 時間後に培養液を回収し LDH 活性を測定した。

3) Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に mTORC1 阻害薬 (rapamycin、10 nM)、mTORC1/2 阻害薬 (Ku-0063794 [Ku]、1 μ M) あるいは p70s6K 阻害薬 (PF-4708671 [PF]、30 μ M) を添加し、24 時間後に培養液を回収し LDH 活性を測定した。

[実験 2] mTORC1 阻害薬が RIP1 活性化上流の分子機構に与える影響の検討

1) Vehicle、TNF あるいは TNF/zVAD 添加と同時に vehicle あるいは rapamycin を添加し、4、8 時間後における complex I、II 及びネクロソーム構成蛋白の蛋白量を定量した。

2) Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) 阻害薬 (5z7、10~100 nM)、I kappa B kinase (IKK) α/β 阻害薬 (TPCA-1、100~250 nM) あるいは cellular inhibitor apoptosis proteins (cIAP) 阻害薬 (BV6、0.3~1 nM) を添加し、12、24 時間後に培養液を回収し LDH 活性を測定した。

[実験 3] mTORC1 阻害薬が RIP1 リン酸化及び RIP1-RIP3 結合に与える影響の検討

1) Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に rapamycin、Ku あるいは PF を添加し、4 時間後における RIP1-Ser166 のリン酸化量を定量した。リン酸化により RIP1 活性を抑制する RIP1-Ser414 が唯一の RXRXX (S/T) 配列上のセリンであることを利用し、抗 RIP1 抗体による免役沈降後に抗リン酸化 RXRXX (S/T) 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、RIP1-Ser414 リン酸化の指標とした。

2) Vehicle、TNF/zVAD、TNF/zVAD+rapamycin を添加 4 時間後に細胞を回収し、RIP1 と RIP3 の結合量を共免疫沈降法で評価した。

[実験 4] mTORC1 及び RIP1 阻害薬が TNF/zVAD によるオートファジー抑制に与える影響の検討

tandem RFP-GFP-LC3 プラスミドを導入し、24 時間後に vehicle、rapamycin、necrostatin-1、TNF/zVAD、TNF/zVAD+rapamycin、あるいは TNF/zVAD+necrostatin-1 を添加した。薬剤添加 4 時間後に LC3 のドット量を蛍光顕微鏡で観察した。オートファゴソームに導入された RFP-GFP-LC3 (黄色) がリソソームと結合しオートリソソームになると GFP のシグナルが退色し、赤色のドットに変化することを利用し、赤色のドット (全 LC3 量) に対する黄色のドット (オートファゴソーム LC3 量) の割合の低下をオートファジー進行の指標として、画像解析装置を用いて定量した。

[実験 5] mTORC1 阻害薬によるネクロプトーシス軽減における ULK1 及びオートファジーの役割の検討

1) Vehicle、TNF あるいは TNF/zVAD 添加と同時に vehicle あるいは rapamycin を添加し、4、8 時間後に細胞を回収し、ULK1、AMPK α 、ACC のリン酸化及び総蛋白量を定量した。

2) ULK1 siRNA 導入後あるいはリソソーム機能阻害薬である濾胞型 H⁺-ATPase 阻害薬 (bafilomycinA1、100 nM) 添加と同時に vehicle、TNF/zVAD、rapamycin あるいは TNF/zVAD+rapamycin を添加し、24 時間後に LDH 活性を測定した。

研究成績

[実験 1]

TNF による RIP1 と caspase-3 の切断は、zVAD の存在下では観察されなかった。TNF/zVAD では vehicle と比較して有意に細胞死が増加したが ($46.1 \pm 2.3\%$ vs. $3.4 \pm 1.3\%$)、necrostatin-1 添加、RIP3 あるいは MLKL 発現抑制にて完全に抑制された。また、TNF/zVAD による細胞死は rapamycin あるいは Ku 添加により軽減したが、PF 添加は影響を与えなかった。

[実験 2]

Rapamycin は、complex I、II 及びネクロソーム構成蛋白の蛋白量あるいは complex I から complex II への移行を反映する TNF による RIP1 の切断レベルに影響を与えなかった。5z7、TPCA-1 あるいは BV6 は、TNF/zVAD 添加 12、24 時間後の細胞死を増悪させたが、rapamycin の細胞死抑制効果は残存していた。

[実験 3]

TNF/zVAD は RIP1-Ser166 のリン酸化を増加させたが、RIP1-Ser414 のリン酸化に影響を与えなかった。Rapamycin あるいは Ku 添加により TNF/zVAD による RIP1-Ser166 のリン酸化レベルが部分的に低下し、RIP1-Ser414 のリン酸化レベルが増加した。一方、PF 添加により RIP1-Ser166 リン酸化レベルは rapamycin あるいは Ku 添加と同程度まで低下したが、RIP1-Ser414 リン酸化レベルには影響を与えなかった。さらに rapamycin は TNF/zVAD による RIP1 と RIP3 の結合増加を抑制した。

[実験 4]

TNF/zVAD 添加 4 時間後にオートファゴソーム LC3 が有意に増加したが、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合は vehicle 群と同様であった。Rapamycin は、TNF/zVAD の有無にかかわらず、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合を低下させた。一方で、necrostatin-1 は TNF/zVAD 存在下において、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合を低下させた。以上の結果から、mTORC1 活性及び RIP1 活性の抑制は、TNF/zVAD によるオートファゴソームからオートリソソームへの進行障害を改善した可能性が示唆された。

[実験 5]

TNF/zVAD は ULK1、AMPK α あるいは ACC のリン酸化に影響を与えなかったが、rapamycin は TNF/zVAD の有無に関わらず ULK1-Ser757 のリン酸化を抑制した。Rapamycin によるネクロプトーシス軽減効果は bafilomycin A1 により遮断されたが、ULK1 発現抑制は影響を与えなかった。

考察

RIP1/RIP3/MLKL の活性化はネクロプトーシス誘導の主要な分子機構であり、薬理的 RIP1 活性阻害や RIP3 ノックアウトマウスでは虚血再灌流後の心筋梗塞サイズ縮小が報

告されている。最近、我々は mTORC1 阻害薬である rapamycin が心筋細胞のネクロプトーシスを軽減することを報告した。さらに本研究では mTORC1/2 阻害薬である Ku-0063794 が rapamycin の効果を疑似したが、p70s6K 阻害薬である PF-4708671 は影響を与えなかった。以上の結果から、mTORC1 活性阻害薬は p70s6K 活性抑制と独立してネクロプトーシスを軽減することが示唆された。

Rapamycin が TNF/zVAD による RIP1-RIP3 結合を抑制したことから、mTORC1 活性阻害による RIP1 活性低下が示唆された。しかし、mTORC1 活性阻害は TNF 受容体刺激により RIP1 が活性化される分子機構には影響を与えなかった。RIP1 の活性は kinase domain の自己リン酸化によって調節されており、RIP1-Ser166 のリン酸化と RIP1 活性レベルには正の相関がある。さらに、RIP1 の intermediate domain における Ser414 を含む複数のセリン残基のリン酸化が RIP1 活性を負に制御する可能性が示唆された。本研究において、mTORC1 活性阻害薬は TNF/zVAD による RIP1-Ser166 のリン酸化を部分的に抑制し、RIP1-Ser414 のリン酸化を増加させた。一方で、p70s6K 活性阻害薬は mTORC1 活性阻害薬と同程度まで RIP1-Ser166 リン酸化を軽減したが、RIP1-Ser414 リン酸化レベルには影響を与えなかった。以上の結果から、mTORC1 活性阻害による RIP1-Ser414 のリン酸化が RIP1 活性抑制の主要な分子機構である可能性が示唆された。本研究では mTORC1 活性阻害が RIP1-Ser414 のリン酸化を誘導する機序は明らかにされなかったが、我々は最近 TNF/zVAD 刺激による RIP1 と選択的オートファジー基質であるユビキチン結合タンパク p62 の結合が、rapamycin あるいは necrostatin-1 による RIP1 活性阻害により抑制されることを報告した。RIP1 の p62 の結合部位 (Lys377) は Ser414 と近接しており、分子内相互作用の存在が想定されるが、RIP1-Ser414 リン酸化調節機構における p62 の役割についてはさらなる検討が必要である。

mTORC1 は、リソソーム生合成の主要な調節転写因子である transcriptional factor EB (TFEB) の Ser142 と Ser211 をリン酸化し、細胞質への移行を促進することにより転写活性を抑制する。非心筋細胞において、RIP1 発現抑制は TFEB を介したリソソーム機能亢進によるオートファジー促進を誘導することが報告された。本研究では necrostatin-1 が rapamycin と同程度に TNF/zVAD によるオートファジー障害を改善したことに加え、rapamycin によるネクロプトーシス抑制効果が bafilomycin A1 により遮断されたことから、RIP1 活性阻害によるオートファジー改善が mTORC1 活性阻害によるネクロプトーシス軽減に寄与している可能性が示唆された。

結語

Rapamycin による mTORC1 活性抑制は、RIP1 の抑制的リン酸化による活性低下を介して TNF/zVAD によるオートファジー障害を修復し、心筋細胞のネクロプトーシスを軽減する。

論文審査の要旨及び担当者

平成 30 年 3 月 2 日提出

(平成 30 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 3023 号	氏 名	安部 功記
論文審査 担 当 者	主査 循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座 教授 三浦 哲嗣	副査	医化学講座 教授 高橋 素子
	副査 薬理学講座 教授 堀尾 嘉幸	委員	細胞生理学講座 教授 當瀬 規嗣

学位論文 の題名	mTORC1 inhibition suppresses necroptosis of cardiomyocytes by restoration of autophagic flux via RIP1 inhibition. (mTORC1 活性阻害は、RIP1 活性抑制を介したオートファジーの回復により心筋細胞のネクロプトーシスを抑制する)
結果の要旨	本研究では、培養心筋細胞を用いて、心筋細胞のネクロプトーシスを rapamycin が軽減する機序を、RIP1 活性化機構とオートファジーに注目して検討したものである。Rapamycin によるネクロプトーシス抑制効果は、mTORC 下流の p70S6K 活性抑制と独立しており、RIP1 活性化上流のネクロプトーシス制御機構の修飾も介していないことを示すとともに、rapamycin は RIP1-Ser414 の抑制的リン酸化によって RIP1 活性を低下させて RIP1-RIP3 の結合を抑制し、その結果ネクロプトーシスシグナルによるオートファジー阻害が軽減されて、ネクロプトーシスが減少するという新規の機序を明らかにした。本研究の結果は、ネクロプトーシスが病態に深く関与する虚血性心疾患や心不全に対する新たな薬物治療開発に向けての重要な示唆を与えるものであり、博士の学位授与に値すると評価された。